

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Náhlavský

Genetické důsledky dramatických změn kontaktu a velikosti populací bobra evropského (*Castor fiber*)
Genetic consequences of bottlenecks and population admixture in Eurasian beaver (*Castor fiber*)

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Konzultant: Ing. Aleš Vorel, Ph.D.

Praha, 2019

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. Mgr. Pavlu Muclingerovi, Ph.D. za jeho nesmírnou vstřícnost, trpělivost a cenné rady a také svému konzultantovi Ing. Aleši Vorlovi, Ph.D. za cenné rady a za to, že mě přivedl ke studiu bobrů. Dále děkuji všem mým blízkým, kteří mě podporovali při psaní této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2019

Podpis

Abstrakt

Bobři prošli v posledních několika staletích dramatickým snížením velikosti populací následovaným expanzí podpořenou reintrodukcemi. V důsledku tohoto bottlenecku je zřejmě genetická variabilita velmi ochuzena. Je známo 31 recentních mitochondriálních haplotypů, přičemž některé byly popsány vícekrát nezávisle na sobě. Tyto haplotypy jsou rozděleny do dvou větví, na jejichž základě je rozpoznávána západní a východní ESU. Lokusy mikrosatelitů mají středně velkou variabilitu, naopak diverzita lokusů na chromozomu Y je velmi nízká. U druhého exonu MHC genu DRB bylo popsáno pouze deset alel. Žádný mitochondriální haplotyp ani MHC alela nejsou sdíleny napříč reliktními populacemi. Tato výrazná genetická struktura není u vzorků z doby před bottleneckem patrná. Popsané poddruhy bobra evropského jsou tedy pouze artefaktem posledního bottlenecku. Nově ustavené populace jsou často tvořeny bobry s různým původem a jsou více či méně prokřížené. Zdá se, že tyto admixované populace vykazují vyšší životaschopnost, a naopak u některých reliktních populací lze najít známky inbrední deprese. Při reintrodukcích je tedy výhodné použít jedince z několika zdrojových reliktních populací, popřípadě použít bobry z admixovaných populací. Více druhů prošlých bottleneckem a recentní expanzí vykazuje podobnosti s populační strukturou bobra evropského.

Klíčová slova: *Castor*, bottleneck, prokříženost, populační genetika, reintrodukce

Abstract

In the last few centuries beavers passed through dramatic declining of the population size followed by expansion supported by reintroductions. The genetical variability is much decreased due to this bottleneck. Current beavers possess 31 known recent mitochondrial haplotypes, among which some were described independently several times. The haplotypes form two clusters, which serve as a base for dividing beaver populations into the west and east ESU. While microsatellite loci show moderate variability, the diversity of Y chromosome loci is very low. There are only ten described alleles of the DRB second exon, which belong to the MHC loci. No mitochondrial haplotype or MHC allele is shared between relict populations. This is not noticeable in samples from the time before the bottleneck. Described subspecies are therefore only the artefact of the recent bottleneck. Newly established populations comprise in many cases beavers of various origin and are more or less admixed. It seems, that the admixed populations have higher viability and conversely in some relict populations it is possible to find the evidence of the inbreeding depression. Thus, for reintroductions it is advantageous to use individuals from several source relict populations or to use beavers from admixed populations. Several species passed through the bottleneck and the recent expansions shows similarities with the population structure of the Eurasian beaver.

Key words: *Castor*, bottleneck, admixture, population genetics, reintroductions

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Bobr evropský jako druh.....	2
2.1 Morfologie, ekologie.....	2
2.2 Historie druhu.....	3
3. Genetické metody.....	4
3.1. Mitochondriální markery.....	4
3.2. Jaderné markery	11
4. Admixované populace.....	13
5. Vliv genetického původu nových populací na jejich životaschopnost.....	14
6. Srovnání genetické situace bobra evropského s dalšími druhy.....	15
7. Závěr.....	18
8. Seznam použité literatury:.....	19

1. Úvod

Bobr evropský je semiakvatický hlodavec, jenž se dříve vyskytoval na většině území Evropy a ve velké části Asie. V devatenáctém století však jeho stavy značně poklesly a na většině svého původního areálu byl vyhuben. V celé Eurasii přežil pouze v osmi malých navzájem izolovaných populacích. Ve dvacátém století se druh začal opět šířit, čemuž napomohla jednak jeho právní ochrana, ale také četné reintrodukční projekty. Dnes již opět obývá většinu svého původního areálu. Pokles stavů však pro bobry znamenal drastický bottleneck, který se odrazil ve snížení jejich genetické variability viditelné na jaderných i mitochondriálních markerech. V nově ustavených populacích se často setkávají bobři různého původu, který je navíc často i nejasný. V posledních letech bylo publikováno několik prací, popisujících genetickou strukturu těchto nových populací, ty však většinou řešily situaci pouze na lokální úrovni a jen omezeně využívaly data z refugiálních populací. Určité paralely v genetické struktuře se dají najít i u jiných druhů prošlých bottleneckem a následnou expanzí.

V této práci chci shrnout důsledky dramatických změn velikosti bobří populace na její genetickou variabilitu, rozplést komplikovanou genetickou strukturu nově ustavených populací v Evropě a srovnat genetickou strukturu bobrů s dalšími většími savci, jež prošli obdobným bottleneckem a následnou reexpanzí. Dále se chci pokusit odhadnout, zda má prokřížení bobrů z různých zdrojových populací vliv na jejich reprodukční schopnosti.

2. Bobr evropský jako druh

Bobři jsou hlodavci náležící do čeledi bobrovitých (Castoridae). Společně s americkými pytloušovitými (Heteromyidae) a pytlonošovitými (Geomyidae) tvoří podřád Castorimorpha. Bobrovití zahrnují dva žijící druhy – bobra evropského (*Castor fiber*) s palearktickým areálem rozšíření a bobra kanadského (*Castor canadensis*) s nearktickým areálem (Wilson *et al.*, 2016).

Bobr kanadský se přirozeně vyskytuje na většině území Severní Ameriky, mimo svůj přirozený areál pak v Argentině, v Chile, ve Finsku, v Rusku a na pomezí Belgie, Německa a Lucemburska (Müller-Schwarze, 2011; Dewas *et al.*, 2012). Oba druhy bobrů jsou si morfologicky i ekologicky dost podobné, v praxi se rozeznávají pomocí genetických metod. Evropští a američtí bobři se spolu navzájem nekříží. K reprodukční bariéře přispívá zřejmě i rozdílný karyotyp - bobř evropský má v diploidním stavu v jádře 48 chromozomů, bobř kanadský jich má 40 (Lavrov & Orlov, 1973).

2.1 Morfologie, ekologie

Dospělí bobři dosahují hmotnosti 15–20 kg, výjimečně až 40 kg, a délky 100–120 cm. Jejich tělo je přizpůsobené k semiakvatickému způsobu života: mají plochý ocas, uzavíratelné chlopně v nozdách a v uších, plovací blánu mezi prsty zadních končetin, nesmáčivou srst, oči jsou kryté průhlednou mžurkou. Bobři mají mohutné žvýkací svaly a stále dorůstající řezáky, které používají k hlodání dřeva. Pyskové svaly se mohou zavřít až za řezáky a bobř tak může ohlodávat větve i pod vodou. Vylučovací, trávicí a rozmnožovací soustava ústí jedním společným otvorem (Müller-Schwarze, 2011; Wilson *et al.*, 2016).

Bobři žijí na řekách, potocích či rybnících, živí se rostlinnou potravou. Kácí stromy, z nichž ohlodávají lýko, a z větví si staví hráze a hrady. Hranice svého území si značí pachovými stopami, tvořenými výměšky análních žláz. Typicky žijí v rodinách tvořených dospělým párem a jejich letošními, loňskými a někdy předloňskými potomky. Studie v Nizozemí a v Norsku zaznamenala průměrný počet jedinců v jedné kolonii 3,0 respektive 4,5 (Campbell *et al.*, 2005). Bobři jsou monogamní, dospělý pár spolu může žít po mnoho let. U bobra kanadského se ukázalo, že se může jednat pouze o tzv. sociální monogamii, kdy dospělý samec obývající kolonii někdy není genetickým otcem všech mláďat (Crawford *et al.*, 2008b). U bobrů evropských se neprokázala přítomnost mláďat nepříbuzných s dospělým samcem, lze je tedy považovat za geneticky monogamní (Syrůčková *et al.*, 2015).

Bobř zastává roli ekosystémového inženýra, tedy druhu, který svou činností modifikuje, vytváří či udržuje stanoviště (Jones *et al.*, 1994). Přehrazením toků vznikají plochy stojaté vody, jež jsou domovem množství bezobratlých (Hering *et al.*, 2001). Toky přehrazené bobřími

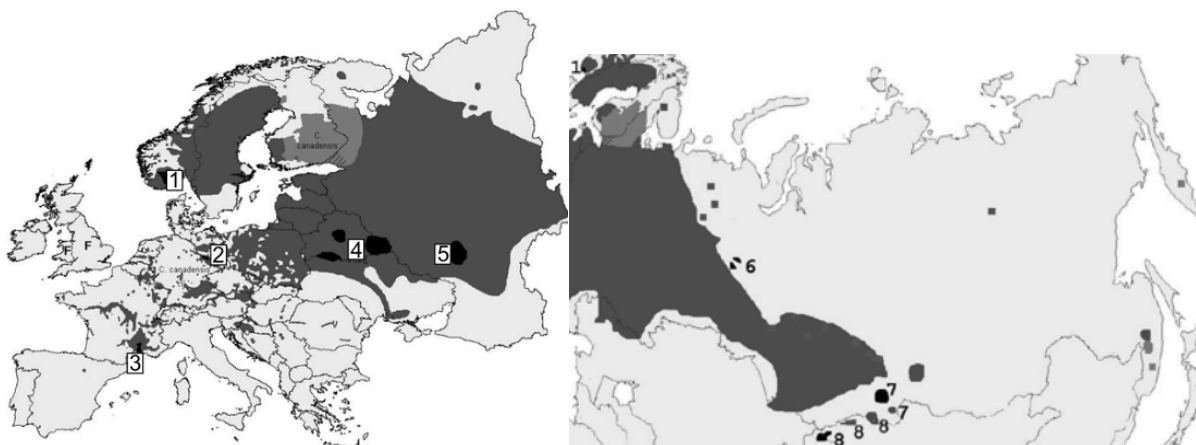
hřázení využívá také významný počet druhů obojživelníků či ptáků (Stringer & Gaywood, 2016). Selektivním okusem může bobr měnit druhové složení dřevin ve svém teritoriu (Haarberg & Rosell, 2006; Nolet *et al.*, 1994). V opuštěných bobřích teritoriích původně zaplavená území postupně vysychají a na jejich místech vznikají tzv. bobří louky, jež mohou tvořit lokální úseky bezlesí v jinak zalesněné krajině (Butler & Malanson, 1995).

2.2 Historie druhu

Poslední společný předek bobra evropského a bobra kanadského žil přibližně před 8 až 7,6 miliony let (Horn *et al.*, 2011). Molekulární data ukazují, že bobři evropští přežili poslední glaciální maximum minimálně ve třech navzájem izolovaných refugiích. Jedno refugium se nejspíše nacházelo v jižní Francii, druhé v deltě Dunaje (potomci bobrů z tohoto refugia vymřeli v průběhu holocénu), třetí se pravděpodobně nacházelo východněji, a jeho přesnější poloha je nejistá (Coles, 2006; Horn *et al.*, 2014). Po konci doby ledové se bobří populace rozšířila do většiny Evropy.

Ve středověku a novověku byl bobr loven pro maso, kožešinu a castoreum (pachové žlázy). Odhaduje se, že na konci devatenáctého století přežívalo pouze asi 1200 jedinců v osmi navzájem izolovaných reliktních populacích, přičemž každá populace byla popsána jako samostatný poddruh (spíše se o poddruhy nejedná, blíže popsáno níže, budu se však těchto pojmenování držet, protože jsou velmi zažitá): v deltě Rhôny (Francie, *Castor fiber galliae*), na Labi (Německo, *C. f. albicus*), v jižním Norsku (*C. f. fiber*), v povodích Dněpru a Němenu v Bělorusku, Rusku a na Ukrajině (*C. f. belorussicus*), na řece Voroněži (Rusko, *C. f. orientoeuropaeus*), na řekách Kondě a Sosvě (Rusko, *C. f. pohlei*), v povodí Jeniseje (*C. f. tuvinicus*) a na řece Bulgan gol (Mongolsko, Čína, *C. f. birulai*) (Obr. 1). Od počátku dvacátého století počet bobrů díky legislativním opatřením a reintrodukcím postupně vzrůstá. V Evropě proběhly desítky reintrodukcí bobrů v různých státech. Vypouštění byli bobři původem z různých reliktních populací (někdy i bobři kanadští, před rokem 1973 byli všichni bobři považováni za jeden druh), takže v Evropě vznikly nové admixované populace (téma shrnuje např. Nolet & Rosell, 1998). K roku 2012 čítala světová populace bobra evropského přes milion jedinců, vyskytujících se ve většině Evropy a v části Asie (Rusko, Kazachstán, Mongolsko a Čína) (Halley *et al.*, 2012).

Dramatická redukce velikosti a kontaktu populací následovaná expanzí a ustavením nových populací, kde se potkávají jedinci s různým původem, potenciálně dělá z bobra evropského zajímavý model populační genetiky.



Obr. 1: Světle šedě je znázorněno rozšíření bobra kanadského v Evropě. Tmavě šedě je rozšíření bobra evropského k r. 2012. Černě jsou zobrazeny refugiální populace: 1 – *Castor fiber fiber*; 2 – *C. f. albicus*; 3 – *C. f. galliae*; 4 – *C. f. belorussicus*; 5 – *C. f. orientoeuropaeus*; 6 – *C. f. pohlei*; 7 – *C. f. tuvinicus*; 8 – *C. f. birulai*. Zdroj: Halley *et al.*, 2012.

3. Genetické metody

Z genetických metod byly a jsou k výzkumu bobrů používány klasický fingerprinting založený na hybridizaci DNA, sekvenace kontrolního regionu mtDNA, MHC genů a YCATS (sekvence na chromozomu Y), analýza mikrosatelitů a jednonukleotidových polymorfismů (SNP).

3.1. Mitochondriální markery

Pro výzkumy na základě mitochondriálních haplotypů se u bobrů používá sekvence hypervariabilní domény I (HV1) kontrolní oblasti (CR) mitochondriálního genomu. Recentní haplotypy jsou rozděleny do dvou větví, vzniklých nejspíše v důsledku stažení se druhu do oddělených refugií během posledního glaciálu, jehož začátek se datuje do doby před 115 000–110 000 lety (Durka *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2014; Senn *et al.*, 2014). Jednotlivé větve jsou uznávány jako ESU (evolučně signifikantní jednotka) *sensu* Moritz (1994). Byla zjištěna nízká diverzita nalezených haplotypů a žádný z nich nebyl sdílený napříč více reliktními populacemi (Durka *et al.*, 2005).

Do západní větve náleží popsané poddruhy *C. f. albicus*, *C. f. galliae* a *C. f. fiber*, do východní větve patří *C. f. birulai*, *C. f. pohlei* a *C. f. tuvinicus*. Situace je složitější u východoevropských poddruhů. První práce (Ducroz *et al.*, 2005; Durka *et al.*, 2005) namísto vzorků z refugií použily vzorky z ruských, polských a litevských populací admixovaných z *C. f. belorussicus* a *C. f. orientoeuropaeus* a tyto dva poddruhy posuzovaly dohromady. Byly nalezeny tři blízké příbuzné haplotypy in1, in2 a in3, náležící do východní větve. Novější práce (Senn *et al.*, 2014) posuzovala i vzorky z předpokládaných refugiálních východoevropských populací a došla ke zcela odlišným výsledkům. V oblasti předpokládaného refugia *C. f. orientoeuropaeus* byl nalezen pouze západní haplotyp jf7, v refugiu *C. f. belorussicus* se

nacházely východní (nh2, nh5) i západní (nh4) haplotypy. Haplotyp in1 tak zůstává znám pouze z Orelské oblasti (Rusko), haplotypy in2 a in3 pouze z polsko-litevské populace.

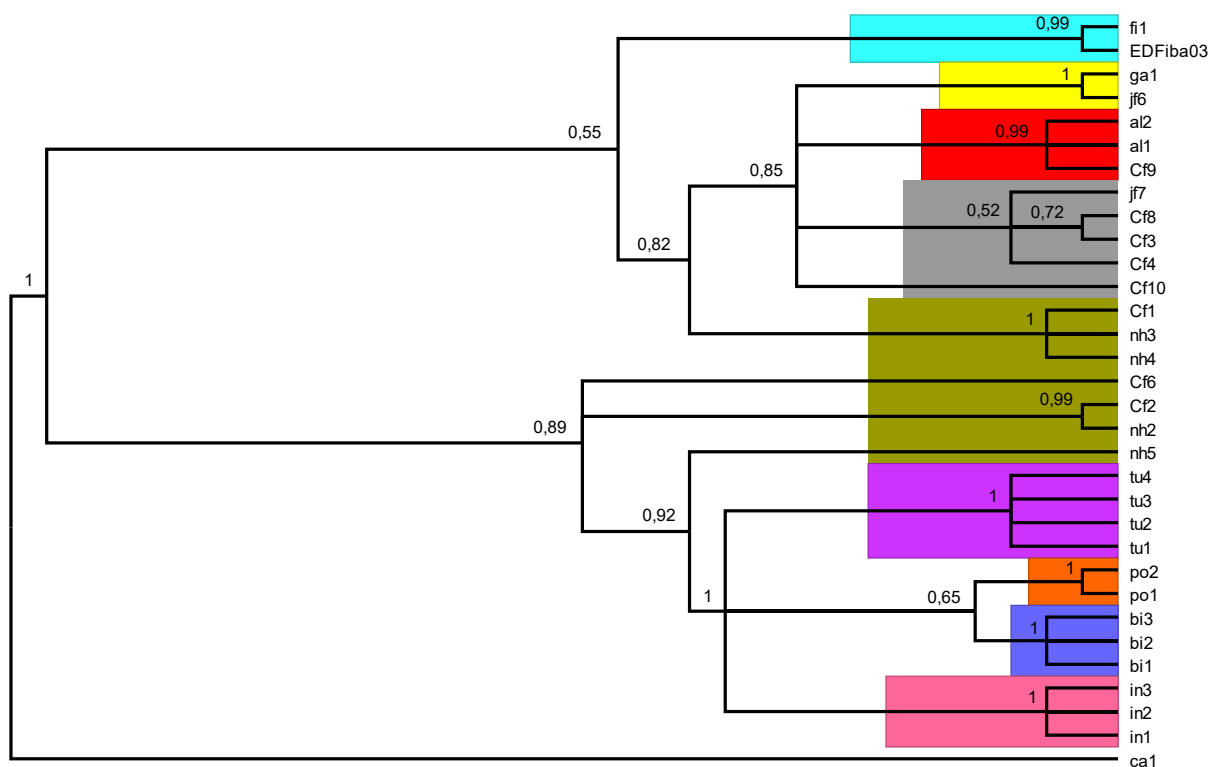
Články zabývající se sekvencí CR v admixovaných populacích vycházely často v rychlém sledu nezávisle na sobě a často popisovaly nové haplotypy, takže se nabízela možnost, že některé haplotypy byly popsány víckrát. Za účelem ověření tohoto předpokladu jsem stáhl dostupné sekvence z GenBank (Ducroz *et al.*, 2005; Durka *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2010; Kropf *et al.*, 2013; Biedrzycka *et al.*, 2014; Frosch *et al.*, 2014; Senn *et al.*, 2014), provedl jejich alignment pomocí ClustalW implementovaného v programu BioEdit (Hall, 1999) a výsledný soubor sekvencí prověřil pomocí nástroje DNA collapser na serveru FaBox (Villesen, 2007). Ukázalo se, že mezi 40 publikovanými sekvencemi se nachází pouze 31 nebo 32 unikátních haplotypů (Tab. 1). Nejednoznačný počet je dán tím, že haplotyp jf8 se od dříve publikovaného haplotypu al1 liší pouze přítomností nerozpoznaného nukleotidu v jedné pozici, sekvence tohoto haplotypu navíc pochází z jedince žijícího na území refugia *C. f. albicus*. Západní větev obsahuje 15 recentních známých haplotypů, východní větev 16 haplotypů.

Z unikátních sekvencí jsem v programu PopART (Leigh & Bryant, 2015) sestavil síť metodou neighbor-joining. Odhadl jsem rozdělení haplotypů do klastrů podle jejich podobnosti a tyto klastry přiřadil k jednotlivým reliktním populacím (viz Obr. 3). Haplotypy in1-3 nalezené v orelské a polsko-litevské populaci admixované z *C. f. belorussicus* a *C. f. orientoeuropaeus* nelze s jistotou zařadit k jednomu či druhému poddruhu. Pro *C. f. belorussicus* hovoří vysoká komplexnost běloruského refugia (mapa v Halley *et al.*, 2012), polsko-litevská populace navíc při analýze SNPs vykazovala větší míru podobnosti s běloruskou než s voroněžskou refugiální populací, u několika jedinců z této populace byl však patrný i výrazný signál náležící voroněžské populaci (Supporting Information v Senn *et al.*, 2014). Za pomoci programu MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) jsem za použití modelu Hasegawa-Kishino-Yano s gama distribucí, který označil za nejvhodnější program MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), vytvořil fylogenetický strom, jež jsem následně upravil v programu FigTree (Rambaut, 2018). Jako outgroup jsem použil sekvenci ca1 (GenBank Accession no. AY623644) z bobra kanadského. Ne všechny klastry měly na základě stromu dostatečnou podporu, ale žádný s ním nebyl v přímém rozporu (viz Obr. 2).

Tabulka 1: Seznam známých recentních mitochondriálních haplotypů bobra evropského, jejich použitých jmen a čísel sekvencí.

* jf8 se od al1 liší pouze přítomností Y (C nebo T) namísto C na pozici 211.

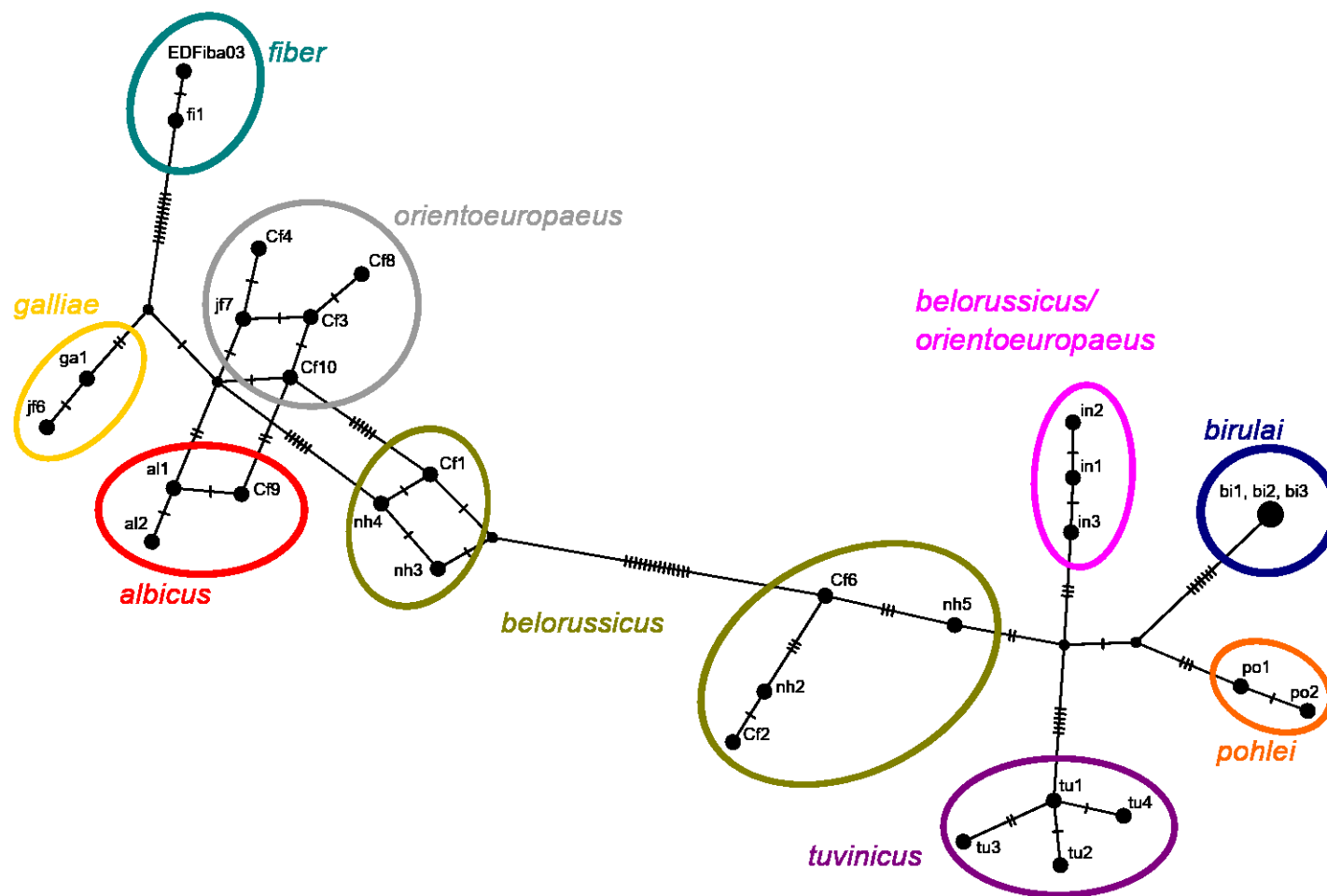
No.	Jméno	GenBank Accession No.	Zdroj
1	in3	AY623643	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
2	in2	AY623642	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
3	in1	AY623641	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
4	gal	DQ088703	(Durka <i>et al.</i> , 2005)
5	fi1	DQ088702	(Durka <i>et al.</i> , 2005)
	COL00027	HF674457	(Kropf <i>et al.</i> , 2013)
6	al2	DQ088701	(Durka <i>et al.</i> , 2005)
7	al1	DQ088700	(Durka <i>et al.</i> , 2005)
	01/033 (jf8) *	JF264888	(Horn <i>et al.</i> , 2010)
8	tu4	AY623640	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
9	tu3	AY623639	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
10	tu2	AY623638	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
11	tu1	AY623637	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
12	po2	AY623636	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
13	po1	AY623635	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
14	bi3	AY623634	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
15	bi2	AY623633	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
16	bi1	AY623632	(Ducroz <i>et al.</i> , 2005)
17	2006-04-09_Cf (jf7, r1)	JF264887	(Horn <i>et al.</i> , 2010)
	COL00024	HF674455	(Kropf <i>et al.</i> , 2013)
	Cf5	KC693757	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
18	NME:M 1845/09 (jf6, ger4)	JF264886	(Horn <i>et al.</i> , 2010)
19	EDFiba03	HF674458	(Kropf <i>et al.</i> , 2013)
20	COL00025	HF674456	(Kropf <i>et al.</i> , 2013)
	Cf7	KC693759	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
	e	KF731637	(Frosch <i>et al.</i> , 2014)
	nh5	KJ670499	(Senn <i>et al.</i> , 2014)
21	Cf10	KC693762	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
22	Cf9	KC693761	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
23	Cf8	KC693760	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
24	Cf6	KC693758	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
25	Cf4	KC693756	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
26	Cf3	KC693755	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
27	Cf2	KC693754	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
28	Cf1	KC693753	(Biedrzycka <i>et al.</i> , 2014)
29	r3	KF731636	(Frosch <i>et al.</i> , 2014)
	nh3	KJ670497	(Senn <i>et al.</i> , 2014)
30	r2	KF731635	(Frosch <i>et al.</i> , 2014)
	nh4	KJ670498	(Senn <i>et al.</i> , 2014)
31	nh2	KJ670496	(Senn <i>et al.</i> , 2014)



Obr. 2: Bayesiánský fylogenetický strom recentních známých haplotypů kontrolní oblasti mtDNA bobra evropského s navrženými klastry příslušícími jednotlivým reliktním populacím. U uzlů jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti.

Západní haplotyp jf7, jenž byl poprvé popsán z různých částí Německa, později i ze severního Rakouska, ze Švýcarska, z Kirovské oblasti (Rusko) a z Polska, byl v pozdější studii přiřazen k *C. f. orientoeuropaeus*. V Polsku byly nalezeny také čtyři jemu blízké příbuzné haplotypy. To je v souladu se zmiňovaným ruským původem některých bobrů reintrodukovaných na území Německa, Rakouska a Polska (Nolet & Rosell, 1998; Frosch *et al.*, 2014).

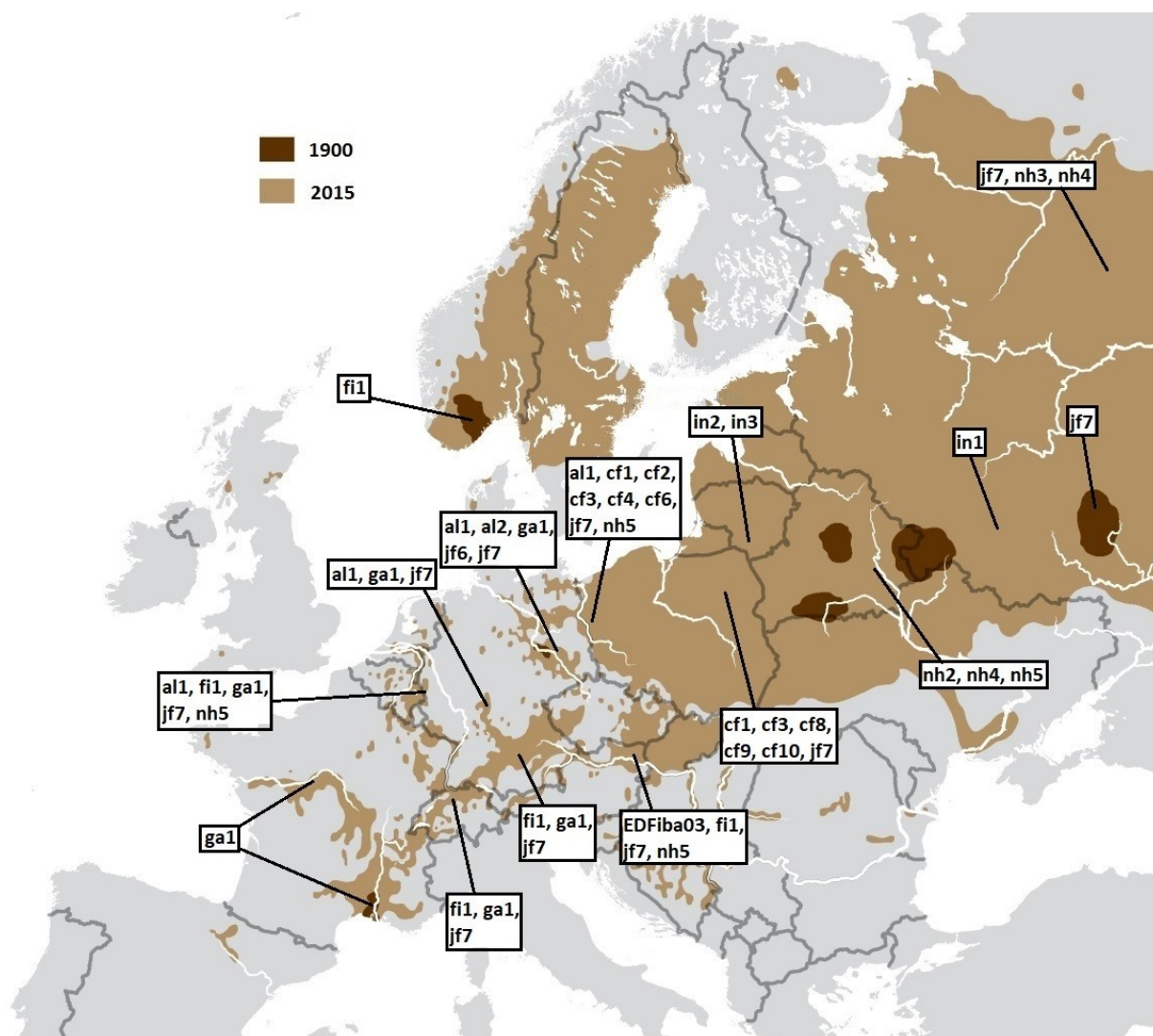
Východní haplotyp nh5 dělí od ostatních známých haplotypů nejméně tři mutace. Byl v rychlém sledu popsán z Rakouska, západního Německa, východního Polska a z refugia *C. f. belorussicus* v Bělorusku. V Polsku byli vypouštěni bobři původem z Ruska a Běloruska, jedinci z Polska byli reintrodukováni do Německa i do Rakouska (Nolet & Rosell, 1998). Tento haplotyp byl v době svého popsání na základě haplotypových sítí z neúplných souborů sekvencí považován za náležící reliktní západosibiřské populaci *C. f. pohlei* (Saveljev & Lavrov, 2016).



Obr. 3: Neighbor-joining síť známých recentních haplotypů kontrolní oblasti mtDNA bobra evropského s navrženými klastry příbuzných haplotypů přidělenými k jednotlivým reliktním populacím. Vlevo jsou haplotypy náležící západní ESU, napravo se nacházejí haplotypy z východní ESU.

Tabulka 2: Seznam jednotlivých popsaných poddruhů bobra evropského, odhad počtu jedinců v době nejmenší velikosti populace (počty a zdroje převzaty z (Halley & Rosell, 2003)), jejich předpokládané mitochondriální haplotypy, ESU na základě haplotypů a MHC alely. V = východní, Z = západní.

Poddruh	Refugium	Min. počet jedinců (zdroj)		Haplotypy	ESU	Alela DRB (GenBank Acc. no.)
<i>galliae</i>	Rhône, Francie	30	(Richard, 1985)	ga1, jf6	Z	<i>Cafî-DRB*07</i> (DQ060692)
<i>fiber</i>	Telemark, Norsko	60–120	(Collet, 1897)	fi1, EDFiba3	Z	<i>Cafî-DRB*02</i> (DQ060687)
<i>albicus</i>	Labe, Německo	200	(Heideke & Hörig, 1986)	al1, al2, Cf9	Z	<i>Cafî-DRB*01</i> (DQ060686)
<i>belorussicus</i>	Dněpr, Němen,	<300	(Zharkov & Sokolov, 1967)	Cf1, nh3, nh4	Z	
	Bělorusko, Rusko, Ukrajina			Cf2, Cf6, nh2, nh5	V	
<i>belorussicus/</i> <i>orientoeuropaeus</i>	(Polsko, Litva, Orěl (Rusko))	-		in1, in2, in3	V	<i>Cafî-DRB*03</i> (DQ060688)
<i>orientoeuropaeus</i>	Voroněž, Rusko	70	(Lavrov & Lavrov, 1986)	jf7, Cf3, Cf4, Cf8, Cf10	Z	
<i>pohlei</i>	Konda, Sosva, Rusko	300	(Lavrov & Lavrov, 1986)	po1, po2	V	<i>Cafî-DRB*06</i> (DQ060691)
						<i>Cafî-DRB*08</i> (DQ060693)
						<i>Cafî-DRB*09</i> (DQ060694)
						<i>Cafî-DRB*10</i> (DQ060695)
<i>tuvanicus</i>	Jenisej, Rusko	30–40	(Lavrov & Lavrov, 1986)	tu1, tu2, tu3, tu4	V	<i>Cafî-DRB*05</i> (DQ060690)
<i>birulai</i>	Bulgan gol, Mongolsko	<100–150	(Lavrov & Hao-chuang, 1961)	bi1, bi2, bi3	V	<i>Cafî-DRB*04</i> (DQ060689)



Obr. 4: Rozmístění mitochondriálních haplotypů v Evropě na základě genetických studií. Mapa s rozšířením bobra evropského v Evropě upravena dle <https://news.nationalgeographic.com/2016/04/160419-beavers-animals-science-sweden-world-wild-cities/> ve znění k 1. 5. 2019. Zdroje: Ducroz *et al.*, 2005; Durka *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2010; Kropf *et al.*, 2013; Senn *et al.*, 2014; Frosch *et al.*, 2014; Biedrzycka *et al.*, 2014; Minnig *et al.*, 2016; Mai *et al.*, 2018.

Při studiu starobylé bobří mtDNA nebyly nalezeny doklady silné fylogenetické struktury, ta je tak nejspíše až důsledkem recentního bottlenecku. Byly nalezeny tři dobře rozlišené větve: recentní západní a východní a navíc vyhynulá dunajská. Dunajská větev zahrnovala pouze vzorky z ústí Dunaje a je možné, že vyhynula až v devatenáctém století, kdy vyhynuli bobři v Rumunsku (Halley *et al.*, 2012). Mimo to byla statisticky dobře podpořena skandinávská podvětev západní větve. Skandinávie byla kolonizována bobry ze západní větve od jihu i příslušníky východní větve od severu. Z okolí obce Gluchowo (Polsko) pocházejí vzorky bobrů ze západní i z východní větve, stáří těchto vzorků se však liší přibližně o 2000 let, není tedy jisté, že se zde příslušníci obou větví potkávali (Horn *et al.*, 2014). Vzorky

z fosilních bobrů pocházejících z Velké Británie náležely do západní linie mimo skandinávskou podvětev (Marr *et al.*, 2018).

3.2. Jaderné markery

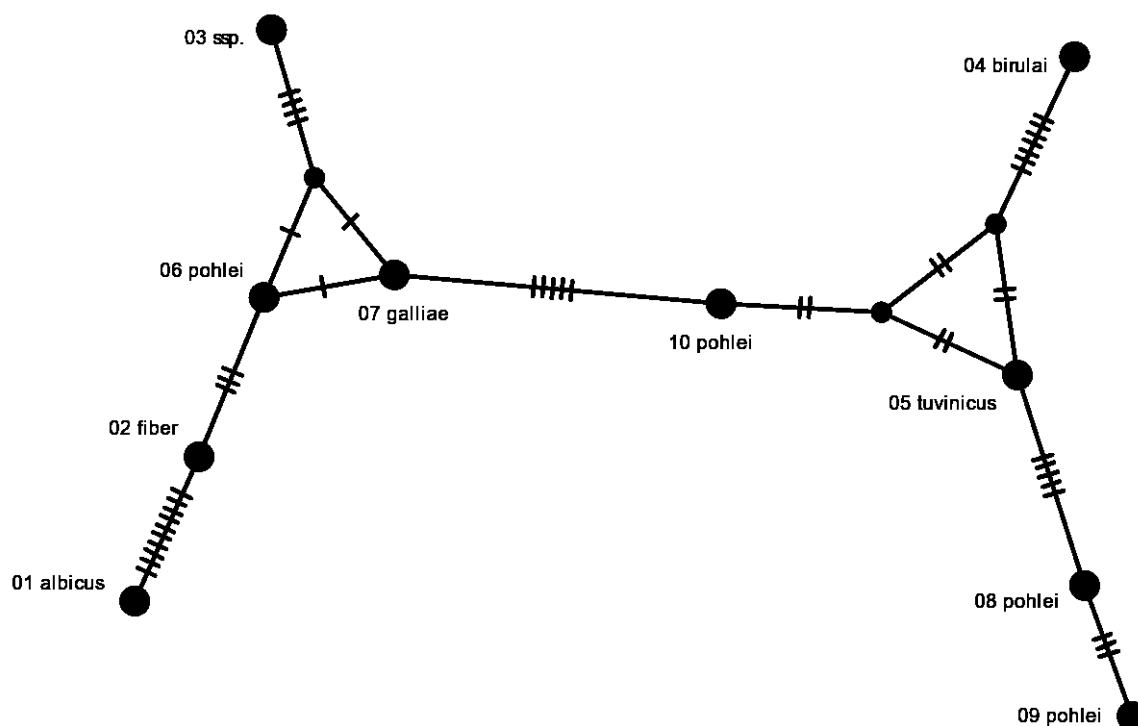
Bobří DNA naštěpená pomocí restriktaáz *Hinf* I nebo *Hae* III a hybridizovaná s probami MS6, MS15 (Jeffreys *et al.*, 1985) nebo M13 (Vassart *et al.*, 1987) vykazovala v populacích v Norsku a ve Švédsku velmi nízkou míru variability. DNA bobrů z okolí Kirova (Rusko) vykazovala větší míru variability, přičemž hodnota APD (průměrný procentuální rozdíl) byla vyšší mezi ruskou a skandinávskou populací než uvnitř ruské populace (Ellegren *et al.*, 1993).

Při studiu sekvencí na chromozomu Y lze využít mimo jiné tzv. YCATS (Y chromosome conserved anchored tagged sequences, konzervované zakotvené označené sekvence na chromozomu Y). Jedná se o sekvence intronů genů lokalizovaných na savčím samčím chromozomu. U bobrů se podařilo amplifikovat čtrnáct těchto sekvencí (DBY6, DBY7, DBY8, DBY9, DBY10, DBY11, DBY13, DBY14, RPS4Y3, SMCY7, SMCY8, SMCY17, později DBY4 a UTY11) (Hellborg & Ellegren, 2003; Biedrzycka *et al.*, 2014). U 44 bobrů z Polska nebyly při amplifikaci šesti z těchto lokusů zjištěny žádné polymorfismy. Lokusy DBY7 a UTY11 byly amplifikovány u jedinců z poddruhů *C. f. albicus*, *C. f. belorussicus*, *C. f. birulai*, *C. f. pohlei* a „*C. f. vistulanus*“ (myšleno nejspíše *C. f. orientoeuropaeus*, viz (Gabrys & Ważna, 2003)). Byla nalezena pouze jedna variabilní pozice, kde u *C. f. birulai* se nacházel thymin a u ostatních cytosin (GenBank Accession no. KF802797-8).

Vzorky z populací v Hällefors (Švédsko) a v okolí Kirova (Rusko) byly podrobeny analýze polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) u MHC genů. DNA byla naštěpena pomocí *Pvu* II a *Taq* I a hybridizována s probami na MHC I a MHC II (DQA, DQB, DRB, DPB). Ani jedna populace nevykazovala polymorfismus, ruská a Švédská populace se navzájem lišily pouze v délce jednoho fragmentu při digesci pomocí *Taq* I při hybridizaci s MHC I a DPB probami (Ellegren *et al.*, 1993).

Při sekvenování druhého exonu DRB bylo v sedmi reliktních populacích (*C. f. belorussicus* a *C. f. orientoeuropaeus* byly posuzovány dohromady) nalezeno celkem 10 alel (Genbank Accession no. DQ060686–95). Žádná alela nebyla sdílena napříč populacemi a pouze populace *C. f. pohlei* vykazovala polymorfismus (4 alely). Navíc se u *C. f. birulai* a *C. f. pohlei* amplifikovaly i dvě sekvence pseudogenu podobné DRB (Genbank Accession no. DQ060696-7). Soubor těchto deseti alel jeví jasné známky působení pozitivní selekce, kdy počet nesynonymních záměn je téměř čtyřikrát vyšší než počet synonymních substitucí (Babik *et al.*, 2005).

Sekvence DRB alel jsem stáhl z Genbank a v programu PopART jsem vytvořil jejich neighbor-joining síť (Obr. 5). Na této síti není zřetelná žádná diferenciace mezi západní a východní ESU a ani všechny alely jediné polymorfické populace *C. f. pohlei* neklastrovaly spolu. To svědčí o přítomnosti balancující selekce, kdy jednotlivé alely přetrvávají v populacích dlouhou dobu i přes působení genetického driftu.



Obr. 5: Neighbor-joining síť sekvencí druhého exonu genu pro DRB bobra evropského. Číslo odpovídá názvu alely, dále je uvedena reliktní populace, z níž byla alela popsána. ssp. označuje polsko-litevskou populaci admixovanou z *C. f. belorussicus* a *C. f. orientoeuropaeus*.

U bobra evropského je známa jedna sada patnácti mikrosatelitových lokusů (Genbank Accession no. HQ698339-53) (Frosch *et al.*, 2011). Ke genetickým analýzám u bobra evropského lze ale využít také dvě existující sady mikrosatelitových lokusů popsanych na bobru kanadském (celkem 19 lokusů, Genbank Accession no. EF524501-8, EF524510-1, EU703999-4007) (Crawford *et al.*, 2008a; Pelz-Serrano *et al.*, 2009). Analýzou mikrosatelitů lze určit původ jedince nebo příbuznost, strukturovanost či genetickou rozmanitost populací. Pomocí mikrosatelitů byly studovány bobří populace v Německu (Frosch *et al.*, 2014; Mai *et al.*, 2018), Polsku (Biedrzycka *et al.*, 2014), Švýcarsku (Minnig *et al.*, 2016) a v České republice a Litvě (Ernst *et al.*, 2017). Polští bobři se dle mikrosatelitů rozdělili do západní a severovýchodní subpopulace s množstvím jedinců se smíšeným původem. V Německu a ve Švýcarsku lze také vidět úspěšné křížení bobrů s různým původem, navíc je evidentní nízká genetická variabilita

uvnitř německé labské reliktní populace. Diverzita alel mikrosatelitů je u bobrů středně velká v porovnání s ostatními druhy savců a větší, než bývá u populací prošlých bottleneckem. (Biedrzycka *et al.*, 2014) Mimo populační genetiku byla analýza mikrosatelitů použita také při určování paternity při studiu monogamie (Syrůčková *et al.*, 2015).

Pomocí Rad-seq (sekvenování nové generace, před kterým je DNA vhodně naštěpena restrikcními enzymy) (Baird *et al.*, 2008) bylo v norské a bavorské bobří populaci popsáno 2579 markerů SNP (Senn *et al.*, 2013). 306 z nich bylo použito ke studii geneticky mapující třináct refugiálních i reintrodukovaných populací. Zvířata byla dle původu rozdělena do pěti klastrů: Norsko, Francie, východní Evropa, centrální Eurasie a *C. f. albicus*. Nejlépe byl rozlišen norský klast. Jde ale pravděpodobně o zkreslení, protože norská populace byla použita k hledání polymorfních lokusů. Naopak menší míra polymorfismu byla u populací, jejichž jedinci nebyli k hledání polymorfismů využiti (například refugiální populace *C. f. tuvinicus* nebo *C. f. birulai*) (Senn *et al.*, 2014).

4. Admixované populace

Z admixovaných populací je pro Českou republiku nejdůležitější situace v Polsku, Bavorsku a Rakousku.

Polská admixovaná populace v roce 2012 čítala 31000–41000 jedinců. V letech 1943 až 1949 bylo v Polsku vypuštěno několik párů bobrů z Voroněže, další reintrodukce proběhly v letech 1975 až 2000, kdy zde bylo reintrodukováno či translokováno 223 jedinců, nejspíše s původem ve východní Evropě. Další bobři přimigrovali do Polska z běloruské populace. Bobři z Polska byli využiti k reintrodukcím do Porýní, Bavorska (Německo), Rakouska, Švýcarska či do České republiky (Halley *et al.*, 2012; Nolet & Rosell, 1998). V Polsku byl nalezen labský haplotyp a1 a jemu příbuzný Cf9, což svědčí o pronikání labských bobrů na východ, dále voroněžský haplotyp jf7 a jemu příbuzné Cf3, Cf4, Cf8 a Cf10, běloruský haplotyp nh5 a sekvence Cf1, Cf2 a Cf6 příbuzné běloruským haplotypům. Na pomezí Polska a Litvy byly objeveny také východoevropské haplotypy in2 a in3. Studie SNPs ukazuje čistě východoevropský původ polsko-litevské populace. Analýza mikrosatelitů odhalila, že se zde nacházejí dvě geneticky rozdílné populace, jedna na západě, druhá na severovýchodě (Biedrzycka *et al.*, 2014; Senn *et al.*, 2014).

Další důležitá admixovaná populace se nachází v Bavorsku (Německo). Mezi lety 1966 a 1980 zde bylo vypuštěno zhruba 120 zvířat ze Švédska, Polska, Ruska a Francie (Schwab & Lutschinger, 2001; Richard, 1985), v roce 2000 se zde nacházelo již přibližně 5000 jedinců, v roce 2012 to bylo již 14000 zvířat (Frosch *et al.*, 2014). Jedinci z této populace byli v rámci

reintrodukčních programů translokování do Chorvatska, Maďarska, Rumunska či Belgie a dispergovali i do České republiky (Schwab & Schmidbauer, 2001; Vorel *et al.*, 2012). V této populaci byly nalezeny haplotypy jf7 (Voroněž), g1 (Francie) a f1 (Norsko) a analýzy mikrosatelitů i SNPs ukázaly vysokou prokříženost populace s dominancí signálů z *C. f. galliae* a z východní Evropy.

V letech 1976–1985 bylo v Rakousku vypuštěno několik desítek bobrů původem z Voroněže, Běloruska, Polska, Norska, ale také z Ameriky (Sieber, 1999). Bobři kanadští tam však v posledních letech naštěstí nebyli nalezeni (Kropf *et al.*, 2013). V roce 2012 čítala populace v Rakousku zhruba 3000 jedinců (Halley *et al.*, 2012), bobři z této populace dispergovali i do Česka a na Slovensko (Sieber, 1999). V této populaci byly nalezeny finské haplotypy fi1 a EDFiba03, voroněžský haplotyp jf7 a běloruský nh5 (Kropf *et al.*, 2013). To je v naprosté shodě s publikovaným původem reintrodukovaných bobrů.

Bobři žijící v České republice pocházejí z několika zdrojových populací: v západních Čechách se šíří bobři z bavorské populace, od severu po Labi expanduje reliktní populace *C. f. albicus*, na jižní Moravě se vyskytují potomci bobrů vypuštěných v Rakousku, do povodí Odry se dostávají bobři z admixované polské populace, v devadesátých letech byly v povodí Moravy a Odry vypuštěny necelé tři desítky jedinců původem z Polska a Litvy (Vorel *et al.*, 2016). V roce 2012 byl celkový počet bobrů v České republice odhadován na 2000–2500 jedinců (Halley *et al.*, 2012). V Českém lese byly, podobně jako v bavorské populaci, nalezeny francouzské a voroněžské mitochondriální haplotypy a převážně francouzský mikrosatelitový signál. Čeští bobři z Labe se geneticky shodují s německou reliktní labskou populací. Na Moravě byly nalezeny norské a voroněžské haplotypy, analýza mikrosatelitů ukázala vysokou míru prokříženosti s převahou signálů z Norska a Běloruska (Albrechtová, 2011).

5. Vliv genetického původu nových populací na jejich životaschopnost

Poddruhy bobra evropského, popsané na základě reliktních populací, se při studiu starobylé bobří DNA (Horn *et al.*, 2014) ukázaly být vzniklé pouze působením genetického driftu v důsledku recentního bottlenecku. V této práci jsou však jejich pojmenování používána pro lepší přehlednost. Jak již bylo výše zmíněno, reliktní populace bobra evropského byly na základě mitochondriálních haplotypů rozděleny do dvou ESUs: západní a východní (Durka *et al.*, 2005). Pozdější studie, zahrnující mitochondriální i jaderné markery, toto rozdělení z větší části podpořila, přičemž se ale ukázala složitá situace u východoevropských populací, kdy voroněžská (*C. f. orientoeuropaeus*) i běloruská (*C. f. belorussicus*) populace vykazují dle jaderných SNPs příbuznost s východními populacemi, avšak v běloruské populaci byly

nalezeny západní i východní mitochondriální haplotypy a ve voroněžské populaci dokonce pouze západní haplotyp (Senn *et al.*, 2014).

Při vybírání zvířat za účelem založení nových populací byly diskutovány tři scénáře: použití jedinců pocházejících z pouze jedné reliktní populace, použití jedinců pocházejících z více reliktních populací v rámci jedné ESU a použití jedinců pocházejících z obou ESUs (Halley, 2011). Rosell *et al.* (2012) považoval za nejbezpečnější první možnost, dokud nebudou k dispozici detailnější genetická data (Rosell *et al.*, 2012). Pouze první dvě možnosti byly také v souladu s tehdejší směrnicí IUCN o reprodukci, která říkala, že „zdrojová populace by ideálně měla být blízce geneticky příbuzná původní populaci a vykazovat ekologické charakteristiky (morfologii, fyziologii, chování, habitatové preference) podobné původní populaci“ (IUCN, 1998). Jemné rozdíly mezi poddruhy byly popsány na základě kranioetrických analýz (Heidecke, 1986), také se ukázalo, že bobři ze Skandinávie intenzivněji reagují na castoreum skandinávských bobrů, než na castoreum labských bobrů (Rosell & Steifetten, 2004). Naproti tomu nová směrnice není tak striktní, vyzdvihuje hlavně potřebu genetické diverzity v nově ustavené populaci, ale varuje i před možností outbrední deprese v případě křížení málo příbuzných linií (IUCN/SSC, 2013).

Inbrední deprese je masivněji studovaný jev, avšak ukazuje se, že outbrední deprese může být stejně škodlivá (Edmands, 2006). Díky důkazům recentního původu fylogenetické strukturovanosti reliktních populací a jejich nízké genetické variability se zdá vhodnější používat k reintrodukcím zvířata z více populací. To podporuje i pozorování, že populace složené z obou východoevropských poddruhů vykazují vyšší reprodukční rychlost oproti oběma východoevropským reliktním populacím (Saveljev & Milishnikov, 2002). Naproti tomu nizozemská populace pocházející pouze z translokovaných labských bobrů vykazuje nízkou reprodukční rychlost (Nolet *et al.*, 2005). Na základě prokříženosti v bavorské a ve švýcarské populaci, kde jsou při analýze SNPs přítomny signály ze západní i z východní ESU, se zdá být možnost outbrední deprese u bobrů nepravděpodobná (Senn *et al.*, 2014). Lze sice ještě uvažovat o možnosti outbrední deprese při křížení bobrů ze západní linie s asijskými poddruhy, ty však pro reintrodukce nejsou samy o sobě moc vhodné kvůli jejich nízké reprodukční rychlosti (Saveljev & Milishnikov, 2002).

6. Srovnání genetické situace bobra evropského s dalšími druhy

Několik druhů větších savců prošlo podobně jako bobr v Evropě bottleneckem kvůli silnému lovu a degradaci biotopů. Je proto zajímavé srovnat jejich genetickou strukturu s bobrem.

Přítomnost tří větví mitochondriální DNA, jejichž divergence se datuje do doby před poslední dobou ledovou a které odpovídají jednotlivým glaciálním refugiím, je typická pro druhy s tzv. medvědí vzorem (Hewitt, 2000). U bobrů se jedná o recentní západní a východní ESU, třetí dunajská větev vyhynula v průběhu holocénu (Horn *et al.*, 2014). Podobný vzor kromě medvěda hnědého (*Ursus arctos*) (Taberlet & Bouvet, 1994) má také například rys ostrovid (*Lynx lynx*) (Rueness *et al.*, 2014) nebo los evropský (*Alces alces*) (Niedziałkowska *et al.*, 2014). Dvě větve mitochondriální DNA se vyskytují v evropských populacích vlka obecného (*Canis lupus*) (Montana *et al.*, 2017). Naproti tomu vydra říční (*Lutra lutra*), jež s bobrem sdílí kromě prostorové niky částečně i historii, se vyznačuje pouze jednou skupinou blízce příbuzných haplotypů s jedním centrálním široce rozšířeným haplotypem a jemu blízce příbuznými méně četnými haplotypy. Haplotypová síť vydřích sekvencí vykazuje hvězdovitý tvar, což svědčí o expanzi z jednoho refugia, jež se mělo nacházet na Apeninském poloostrově (Mucci *et al.*, 2010).

Historické snížení velikostí populací a omezení jejich kontaktu následované recentní expanzí je kromě bobra typické hlavně pro velké šelmy, které se bobrům podobají i komplikovanými vztahy s člověkem. Většina evropských populací velkých šelem je stabilní nebo roste (Chapron *et al.*, 2014). U medvěda existuje jedna evropská populace vzniklá reintrodukcí, nacházející se v Alpách, rys má v Evropě šest reintrodukovaných populací. Zatímco evropské populace medvěda hnědého se na základě studia mitochondriální DNA vyznačují vysokou genetickou strukturovaností (Taberlet & Bouvet, 1994) a mitochondriální i jaderné markery poukazují na omezený genetický tok mezi evropskými populacemi rysa ostrovida (Ratkiewicz *et al.*, 2012, 2014), u vlků je genový tok výraznější a jsou zaznamenány migrace na dlouhé vzdálenosti (Hindrikson *et al.*, 2017; Hulva *et al.*, 2018). Zatímco u bobrů byla diverzita mikrosatelitových alel nižší v reliktní populaci oproti populacím vzniklým reintrodukcí, u rysů měly reintrodukované populace relativně nižší počet alel než populace původní (Frosch *et al.*, 2014; Bull *et al.*, 2016). U rysa i u bobra byla nalezena redukce variability na chromozomu Y (Hellborg & Ellegren, 2003).

Svišť horský (*Marmota marmota*) má podobně jako bobr evropský nízký počet alel MHC genu DRB nejspíše následkem bottlenecku. Tyto alely se nacházejí na dvou různých lokusech, které jsou oba transkribované (Kuduk *et al.*, 2012). Minimálně pět prepisovaných lokusů genu DRB má blízky příbuzný bobrů, americká tarbíkomys dvoubarvá (*Dipodomys spectabilis*) (Busch *et al.*, 2008). Pouze u některých studovaných bobrů evropských byly kromě DRB amplifikovány i odlišné sekvence a jedná se zde nejspíše o pseudogeny (Babik *et al.*, 2005). Vlk obecný má na rozdíl od bobra evropského zachovanou poměrně velkou variabilitu v alelách

MHC genů i v populacích, jež byly zasaženy bottleneckem (Hindrikson *et al.*, 2017). U zubra evropského (*Bison bonasus*) byla zaznamenána redukce variability alel DRB vlivem drastického bottlenecku, narozdíl od bobra však zubr neprošel opětovnou expanzí početních stavů (Radwan *et al.*, 2007).

7. Závěr

Genetická variabilita bobra evropského je značně ochuzena vlivem recentního bottlenecku. Toto ochuzení je znatelné na mitochondriálních i jaderných markerech. Nebyly nalezeny žádné mitochondriální haplotypy ani alely MHC II genů, jež by byly sdíleny napříč osmi reliktními populacemi. Výzkum starobylé DNA však ukázal, že tato struktura je pouze důsledkem recentního snížení populace a rozdělení na osm poddruhů je tedy u bobra pouze artefaktem tohoto bottlenecku. Mitochondriální haplotypy jsou rozděleny na dvě větve vlivem stažení se druhu do oddělených refugií v období posledního glaciálu. U alel MHC genu DRB není toto rozdělení zřetelné, je zde tedy pravděpodobnost balancující selekce. V nově ustavených populacích se často potkávají bobři s různým původem a jejich genetická struktura často bývá složitá. Vlivem lokálního zaměření většiny genetických studií v těchto admixovaných populacích byly některé haplotypy popsány několikrát nezávisle na sobě pod různými jmény. Díky vysoké prokříženosti a viabilitě těchto nových populací se zdá být riziko outbrední deprese u bobra evropského zanedbatelné. Naopak reliktní populace a populace z nich odvozené často vykazují nižší množivost, což značí přítomnost inbrední deprese. Existují i další větší druhy savců, které v Evropě prošly snížením velikosti populací a následnou reexpansí. Genetická struktura jejich populací vykazuje větší či menší podobnosti s genetickou strukturou bobra evropského.

Další genetické výzkumy by se mohly týkat například zmapování genetické struktury v dalších admixovaných populacích, objasněním variability dalších molekulárních markerů (například Toll-like receptorů, lipokalinů) či chování alel genů, jež jsou pod selekcí, v admixovaných populacích.

8. Seznam použité literatury:

- Albrechtová A (2011) Hybridní původ bobrů ve střední Evropě. Praha. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.
- Babik W, Durka W & Radwan J (2005) Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology* **14**: 4249–4257
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA & Johnson EA (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE* **3**: e3376
- Biedrzycka A, Konior M, Babik W, Świsłocka M & Ratkiewicz M (2014) Admixture of two phylogeographic lineages of the Eurasian beaver in Poland. *Mammalian Biology* **79**: 287–296
- Bull JK, Heurich M, Saveljev AP, Schmidt K, Fickel J & Förster DW (2016) The effect of reintroductions on the genetic variability in Eurasian lynx populations: the cases of Bohemian–Bavarian and Vosges–Palatinian populations. *Conservation Genetics* **17**: 1229–1234
- Busch JD, Waser PM & DeWoody JA (2008) Characterization of expressed class II MHC sequences in the banner-tailed kangaroo rat (*Dipodomys spectabilis*) reveals multiple DRB loci. *Immunogenetics* **60**: 677–688
- Butler DR & Malanson GP (1995) Sedimentation rates and patterns in beaver ponds in a mountain environment. *Geomorphology* **13**: 255–269
- Campbell RD, Rosell F, Nolet BA & Dijkstra VAA (2005) Territory and group sizes in Eurasian beavers (*Castor fiber*): echoes of settlement and reproduction? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **58**: 597–607
- Chapron G, Kaczensky P, Linnell JDC, Von Arx M, Huber D, Andrén H, López-Bao JV, Adamec M, Álvares F, Anders O, Balečiauskas L, Balys V, Bedő P, Bego F, Blanco JC, Breitenmoser U, Brøseth H, Bufka L, Bunikyte R, Ciucci P, *et al.* (2014) Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science* **346**: 1517–1519
- Coles B (2006) Beavers in Britain's past. Oxbow Books
- Collet R (1897) Bæveren i Norge, dens Utbredelsen og Levemaade 1896. *Bergens Museums Aarbog* **1**: 1–139
- Crawford JC, Liu Z, Nelson TA, Nielsen CK & Bloomquist CK (2008a) Isolation and characterization of microsatellite loci in the beaver (*Castor canadensis*). *Molecular Ecology Resources* **8**: 616–618
- Crawford JC, Liu Z, Nelson TA, Nielsen CK & Bloomquist CK (2008b) Microsatellite analysis of mating and kinship in beavers (*Castor canadensis*). *Journal of Mammalogy* **89**: 575–581
- Dewas M, Herr J, Schley L, Angst C, Manet B, Landry P & Catusse M (2012) Recovery and status of native and introduced beavers *Castor fiber* and *Castor canadensis* in France and neighbouring countries. *Mammal Review* **42**: 144–165
- Ducroz J-F, Stubbe M, Saveljev AP, Heidecke D, Samjaa R, Ulevičius A, Stubbe A & Durka W (2005) Genetic variation and population structure of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) in eastern Europe and Asia. *Journal of Mammalogy* **86**: 1059–1067
- Durka W, Babik W, Ducroz JF, Heidecke D, Rosell F, Samjaa R, P. Saveljev A, Stubbe A, Ulevičius A & Stubbe M (2005) Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. *Molecular Ecology* **14**: 3843–3856
- Edmunds S (2006) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* **16**: 463–475

- Ellegren H, Hartman G, Johansson M & Andersson L (1993) Major histocompatibility complex monomorphism and low levels of DNA fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **90**: 8150–8153.
- Ernst M, Putnová L, Štohl R & Matoušková J (2017) Comparison of Czech and Latvian beaver population by microsatellite analysis and genetic differences between *Castor fiber* and *Castor canadensis*. *Transylvanian Review* **25**: 5339–5349
- Frosch C, Haase P & Nowak C (2011) First set of microsatellite markers for genetic characterization of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) based on tissue and hair samples. *European Journal of Wildlife Research* **57**: 679–682
- Frosch C, Kraus RHS, Angst C, Allgöwer R, Michaux J, Teubner J & Nowak C (2014) The genetic legacy of multiple beaver reintroductions in central Europe. *PLoS ONE* **9**: e97619
- Gabryś G & Ważna A (2003) Subspecies of the European beaver *Castor fiber* Linnaeus, 1758. *Acta Theriologica* **48**: 433–439
- Haarberg O & Rosell F (2006) Selective foraging on woody plant species by the Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Telemark, Norway. *Journal of Zoology* **270**: 201–208
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41**: 95–98
- Halley DJ, Rosell F & Saveljev AP (2012) Population and distribution of *Castor fiber*. *Baltic Forestry* **18**: 168–175
- Halley DJ (2011) Sourcing Eurasian beaver *Castor fiber* stock for reintroductions in Great Britain and Western Europe. *Mammal Review* **41**: 40–53
- Heidecke D (1986) Taxonomische Aspekte des Artenschutzes am Beispiel der Biber Eurasiens. *Hercynia N. F.* **22**: 146–161
- Heidecke D & Hörig K-J (1986) Bestands- und Schutzsituation des Elbebibers. *Halle & Magdeburg* **23**: 1–14
- Hellborg L & Ellegren H (2003) Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of mammalian male-specific DNA. *Molecular Ecology* **12**: 283–291
- Hering D, Gerhard M, Kiel E, Ehlert T & Pottgiesser T (2001) Review study on near-natural conditions of Central European Mountains streams, with particular reference to Debris and Beaver dams: Results of the ‘REG meeting’ 2000. *Limnologica* **31**: 81–92
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907–913
- Hindrikson M, Remm J, Pilot M, Godinho R, Stronen AV, Baltrūnaitė L, Czarnomska SD, Leonard JA, Randi E, Nowak C, Åkesson M, López-Bao JV, Álvares F, Llana L, Echegaray J, Vilà C, Ozolins J, Rungis D, Aspi J, Paule L, *et al.* (2017) Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological Reviews* **92**: 1601–1629
- Horn S, Durka W, Wolf R, Ermala A, Stubbe A, Stubbe M & Hofreiter M (2011) Mitochondrial genomes reveal slow rates of molecular evolution and the timing of speciation in beavers (*Castor*), one of the largest rodent species. *PLoS ONE* **6**: e14622
- Horn S, Prost S, Stiller M, Makowiecki D, Kuznetsova T, Benecke N, Pucher E, Hufthammer AK, Schouwenburg C, Shapiro B & Hofreiter M (2014) Ancient mitochondrial DNA and the genetic history of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Europe. *Molecular Ecology* **23**: 1717–1729
- Horn S, Teubner J, Teubner J & Heidecke D (2010) Mitochondrial DNA of beavers (*Castor*) in Germany. *Artenschutzreport* **26**: 72–78
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754–755

- Hulva P, Černá Bolfíková B, Woznicová V, Jindřichová M, Benešová M, Myslajek RW, Nowak S, Szewczyk M, Niedźwiecka N, Figura M, Hájková A, Sándor AD, Zyka V, Romportl D, Kutal M, Find'o S & Antal V (2018) Wolves at the crossroad: Fission–fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. *Diversity and Distributions* **24**: 179–192
- IUCN/SSC (2013) Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0 Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission
- IUCN (1998) IUCN Guidelines for Re-introductions. Prepared by IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN
- Jeffreys AJ, Wilson V & Thein SL (1985) Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* **314**: 67–73
- Jones CG, Lawton JH & Shachak M (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**: 373–376
- Kropf M, Holzler G & Parz-Gollner R (2013) Genetic evidence on the origin of the current beaver (*Castor fiber*) population in Lower Austria. *Sumarski List* **11–12**: 591–596
- Kuduk K, Johanet A, Allainé D, Cohas A & Radwan J (2012) Contrasting patterns of selection acting on MHC class I and class II DRB genes in the Alpine marmot (*Marmota marmota*). *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 1686–1693
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547–1549
- Lavrov LS & Hao-chuang L (1961) Present conditions and ecological peculiarities of beaver (*Castor fiber* L.) natural colonies in Asia. *Vestnik Leningrad Univ* **9**: 72–89
- Lavrov LS & Lavrov VL (1986) Distribution of original and aboriginal beaver populations in the USSR. *Zoologische Abhandlungen* **41**: 105–109
- Lavrov LS & Orlov VN (1973) Karyotypes and taxonomy of modern beavers (*Castor*, Castoridae, Mammalia). *Zoologicheskii Zhurnal* **52**: 734–742
- Leigh JW & Bryant D (2015) POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*
- Mai S, Weinhardt M, Allgöwer R & Merker S (2018) Recolonizing lost habitat—how European beavers (*Castor fiber*) return to south-western Germany. *Mammal Research* **63**: 255–265
- Marr MM, Brace S, Schreve DC & Barnes I (2018) Identifying source populations for the reintroduction of the Eurasian beaver, *Castor fiber* L. 1758, into Britain: evidence from ancient DNA. *Scientific Reports* **8**: 2708
- Minnig S, Angst C & Jacob G (2016) Genetic monitoring of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Switzerland and implications for the management of the species. *Russian Journal of Theriology* **15**: 20–27
- Montana L, Caniglia R, Galaverni M, Fabbri E, Ahmed A, Bolfíková BČ, Czarnomska SD, Galov A, Godinho R, Hindrikson M, Hulva P, Jędrzejewska B, Jelenčič M, Kutal M, Saarma U, Skrbinšek T & Randi E (2017) Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated Wolf population. *PLoS ONE* **12**: e0176560
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: A critical review. *Molecular Ecology* **3**: 401–411
- Mucci N, Arrendal J, Ansorge H, Bailey M, Bodner M, Delibes M, Ferrando A, Fournier P, Fournier C, Godoy JA, Hajkova P, Hauer S, Heggberget TM, Heidecke D, Kirjavainen H, Krueger HH, Kvaloy K, Lafontaine L, Lanszki J, Lemarchand C, *et al.* (2010) Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. *Conservation Genetics* **11**: 583–599

- Müller-Schwarze D (2011) The beaver: Its life and impact 2nd ed. Comstock Publishing Associates.
- Niedziałkowska M, Hundertmark KJ, Jedrzejewska B, Niedziałkowski K, Sidorovich VE, Górny M, Veeroja R, Solberg EJ, Laaksonen S, Sand H, Solovyev VA, Shkvyrina M, Tiainen J, Okhlopkov IM, Juškaitis R, Done G, Borodulin VA, Tulandin EA & Jedrzejewski W (2014) Spatial structure in European moose (*Alces alces*): Genetic data reveal a complex population history. *Journal of Biogeography* **41**: 2173–2184
- Nolet BA, Broftová L, Heitkönig IMA, Vorel A & Kostkan V (2005) Slow growth of a translocated beaver population partly due to a climatic shift in food quality. *Oikos* **111**: 632–640
- Nolet BA, Hoekstra A & Ottenheim MM (1994) Selective foraging on woody species by the beaver *Castor fiber*, and its impact on a riparian willow forest. *Biological Conservation* **70**: 117–128
- Nolet BA & Rosell F (1998) Comeback of the beaver *Castor fiber*: An overview of old and new conservation problems. *Biological Conservation* **83**: 165–173
- Pelz-Serrano K, Munguia-Vega A, Piaggio AJ, Neubauer M, Munclinger P, Pártl A, Van Riper C & Culver M (2009) Development of nine new microsatellite loci for the American beaver, *Castor canadensis* (Rodentia: Castoridae), and cross-species amplification in the European beaver, *Castor fiber*. *Molecular Ecology Resources* **9**: 551–554
- Radwan J, Kawałko A, Wójcik JM & Babik W (2007) MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology* **16**: 531–540
- Rambaut A (2018) FigTree v. 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (k 4.5.2019)
- Ratkiewicz M, Matusiuk M, Kowalczyk R, Konopiński MK, Okarma H, Ozolins J, Männil P, Ornicans A & Schmidt K (2012) High levels of population differentiation in Eurasian lynx at the edge of the species' western range in Europe revealed by mitochondrial DNA analyses. *Animal Conservation* **15**: 603–612
- Ratkiewicz M, Matusiuk M, Saveljev AP, Sidorovich V, Ozolins J, Männil P, Balciuskas L, Kojola I, Okarma H, Kowalczyk R & Schmidt K (2014) Long-range gene flow and the effects of climatic and ecological factors on genetic structuring in a large, solitary carnivore: The Eurasian lynx. *PLoS ONE* **9**: e115160
- Richard PB (1985) Peculiarities of the ecology and management of the Rhodanian beaver *Castor fiber* L. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* **72**: 143–152
- Rosell F, Campbell-Palmer R & Parker H (2012) More genetic data are needed before populations are mixed: Response to 'Sourcing Eurasian beaver *Castor fiber* stock for reintroductions in Great Britain and Western Europe'. *Mammal Review* **42**: 319–324
- Rosell F & Steifetten Ø (2004) Subspecies discrimination in the Scandinavian beaver (*Castor fiber*): combining behavioral and chemical evidence. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 902–909
- Rueness EK, Naidenko S, Trosvik P & Stenseth NC (2014) Large-scale genetic structuring of a widely distributed carnivore - The eurasian lynx (*Lynx lynx*). *PLoS ONE* **9**: e93675
- Saveljev AP & Milishnikov AN (2002) Biological and genetic peculiarities of cross-composed and aboriginal beaver populations in Russia. *Acta Zoologica Lituanica* **12**: 397–402
- Saveljev AP & Lavrov VL (2016) About possible ways of genes penetration from West Siberian beavers *Castor fiber pohlei* into Austria. *Russian Journal of Theriology* **15**: 78–79
- Schwab G & Lutschinger G (2001) The return of the beaver (*Castor fiber*) to the Danube watershed. In *The European Beaver in a new millennium. Proceedings of 2nd European Beaver Symposium*. Carpathian Heritage Society.

- Schwab G & Schmidbauer M (2001) The Bavarian beaver re-extroductions. In *The European Beaver in a new millennium. Proceedings of the 2nd European Beaver Symposium*. Carpathian Heritage Society.
- Senn H, Ogden R, Cezard T, Gharbi K, Iqbal Z, Johnson E, Kamps-Hughes N, Rosell F & McEwing R (2013) Reference-free SNP discovery for the Eurasian beaver from restriction site-associated DNA paired-end data. *Molecular Ecology* **22**: 3141–3150
- Senn H, Ogden R, Frosch C, Syrůčková A, Campbell-Palmer R, Munclinger P, Durka W, Kraus RHS, Saveljev AP, Nowak C, Stubbe A, Stubbe M, Michaux J, Lavrov V, Samiya R, Ulevicius A & Rosell F (2014) Nuclear and mitochondrial genetic structure in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) - implications for future reintroductions. *Evolutionary Applications* **7**: 645–662
- Sieber J (1999) The austrian beaver, *Castor fiber*, reintroduction program. In *Beaver Protection, Management, and Utilization in Europe and North America*. Springer.
- Stringer AP & Gaywood MJ (2016) The impacts of beavers *Castor* spp. on biodiversity and the ecological basis for their reintroduction to Scotland, UK. *Mammal Review* **46**: 270–283
- Syrůčková A, Saveljev AP, Frosch C, Durka W, Savelyev AA & Munclinger P (2015) Genetic relationships within colonies suggest genetic monogamy in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Mammal Research* **60**: 139–147
- Taberlet P & Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **255**: 195–200
- Vassart G, Georges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarre A & Christophe D (1987) A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* **235**: 683–684
- Villesen P (2007) FaBox: An online toolbox for FASTA sequences. *Molecular Ecology Notes*. **7**: 965–968
- Vorel A, Dostál T, Uhlíková J, Korbelová J & Koudelka P (2016) Průvodce v soužití s bobrem. ČZU v Praze.
- Vorel A, Šafář J & Šimůnková K (2012) Recentní rozšíření bobra evropského (*Castor fiber*) v České republice v letech 2002–2012 (Rodentia: Castoridae). *Lynx* **43**: 149–179
- Wilson DE, Lacher TE & Mittermeier RA (eds) (2016) Handbook of the mammals of the World. Vol. 6 Lagomorphs and Rodents I. Lynx Edicions.
- Zharkov I V. & Sokolov VE (1967) The European beaver (*Castor fiber* Linnaeus, 1758) in the Soviet Union. *Acta Theriologica* **12**: 27–46